

□全国高等学校农林规划教材

# 高级生物化学实验

Advanced  
Biochemistry  
Experiments

汪晓峰 杨志敏 主编



高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS

□全国高等学校农林规划教材

# 高级生物化学实验

GAOJI SHENGWU HUAXUE SHIYAN



主 编 汪晓峰（北京林业大学）  
杨志敏（南京农业大学）

副主编（按姓氏笔画排序）

王冬梅（河北农业大学）  
杨虹琦（湖南农业大学）  
沈文彪（南京农业大学）  
陈红漫（沈阳农业大学）  
蒋立科（安徽农业大学）  
潘登魁（山西农业大学）

参 编（按姓氏笔画排序）

马 镛（沈阳农业大学）  
文 汉（安徽农业大学）  
刘 刚（河北农业大学）  
刘雪萍（北京林业大学）  
杨海灵（北京林业大学）  
张先文（湖南农业大学）  
陈玉珍（北京林业大学）  
林善枝（北京林业大学）  
罗 曼（暨南大学）  
侯春燕（河北农业大学）  
阚国仕（沈阳农业大学）  
穆姝慧（安徽农业大学）



高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

## 内容简介

本书是根据国内外生物化学技术的最新研究进展和发展趋势,结合各高校近十年来的科学研究和实验教学,经反复修改、充实撰写而成。编者均为各高等院校从事生物化学教学的资深教师。全书共分8章包含一些生物大分子的分离、层析、电泳等传统实验项目,旨在加强研究生基本实验方法和技能的训练,同时又编入了近年来发展起来的一些综合性实验技术,将生物化学实验技能集成化。本书宗旨在于培养学生严谨求实的科研态度、分工协作的团队精神、创造性思维和独立分析与解决问题的能力。书末的附录还包括了离心原理、常用试剂和溶液的配制等。

本书适用于高等院校农林和生物学等专业研究生和本科生选择使用。

## 图书在版编目(CIP)数据

高级生物化学实验/汪晓峰,杨志敏主编. —北京:  
高等教育出版社,2010.7  
ISBN 978-7-04-028616-8

I. ①高… II. ①汪…②杨… III. ①生物化学-化  
学实验 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第082391号

策划编辑 高新景 责任编辑 孟丽 封面设计 张志奇 责任绘图 尹莉  
版式设计 张岚 责任校对 杨雪莲 责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社  
社址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120

经销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印刷 北京市南方印刷厂

开本 787×1092 1/16  
印张 11.75  
字数 280 000

购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598  
网址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landaco.com>  
<http://www.landaco.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版次 2010年7月第1版  
印次 2010年7月第1次印刷  
定价 19.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究  
物料号 28616-00

# 前 言

生物化学是生命科学中一门重要的基础学科。它既是一门理论科学,也是一门实验科学,与生命科学领域中诸多分支学科(如分子生物学等)及相关产业(如医药、环保、能源及食品等)有着千丝万缕的关系。现代生物化学技术作为新世纪生命科学发展的标志性学科,是生物化学学科的主要组成部分,也是我国高等院校生命科学研究教学领域中的重要环节。为了适应生命科学的高速发展以及加速培养国家生命科学高科技领域人才的步伐,2009年高等教育出版社组织了国内相关高等农林院校教师编写了这部《高级生物化学实验》教材。

本书是一本具有特色、适用于我国高等农林院校生命科学研究生及高年级本科生生物化学实验教学的教材,是根据国内外生物化学技术的最新研究成果和发展趋势,结合各个学校近十年来的科学研究和实验教学,经反复修改、充实撰写而成。

本书共分八章及附录。第1~3章侧重于学生基本技能的训练和培养,如缓冲溶液的作用原理及配制、生物材料的预处理和实验误差控制。后续几章分别为蛋白质化学与酶学研究技术、核酸化学、糖类和次生代谢物的分离提取等内容。每一章先设置总论,之后提供具有代表性的实验供学生实践。全书包含一些生物大分子的分离、层析、电泳等传统实验项目,旨在加强研究生基本实验方法和技能的训练,又编入了近年发展起来的蛋白质2-DE技术、小RNA分离鉴定等综合性实验技术,将生物化学实验技能集成化。本书旨在培养学生严谨求实的科研态度、分工协作的团队精神、创造性思维和独立分析与解决问题的能力。

本书编写得益于相关院校同行的大力支持。编者均为各高等院校从事生物化学教学的资深教师。他们具有深厚的专业功底和高度的敬业精神,业务精湛,将长期工作在教学第一线的成果集结成文。由于生物化学实验技术发展迅速,难免存在错误和疏漏,竭诚希望热心读者不吝赐教,以便再版时改正。

编 者

2010年1月25日



# 目 录

第一章 缓冲溶液的作用原理及配制	1	三、以蛋白质分子大小为基础的分 方法	24
第一节 缓冲溶液的作用原理	1	四、以蛋白质生物活性为基础的分 方法	25
一、缓冲溶液的作用原理	1	第二节 蛋白质分离纯化的新技术与 新方法	25
二、缓冲容量与缓冲范围	2	一、蛋白质二维荧光差异凝胶电泳 技术	25
第二节 缓冲溶液的配制	2	二、毛细管电泳	27
一、影响缓冲溶液 pH 的因素及缓冲溶液 的选择与配制	2	三、反相液相色谱法	28
二、缓冲溶液的应用原则	3	四、反胶团萃取法	28
三、不同缓冲溶液的优缺点	3	五、蛋白质分离方法的选择、组合和 优化	29
第二章 生物材料的预处理	7	实验一 蛋白质含量测定法	29
第一节 生物样品的保存	7	I. 微量凯氏定氮法(Kjeldahl 法)	30
一、新鲜固态样品的保存	7	II. 双缩脲法(Biuret 法)	33
二、液态样品的保存	7	III. Folin-酚试剂法(Lowry 法)	34
第二节 生物材料预处理技术	8	IV. 考马斯亮蓝法(Bradford 法)	36
一、细胞的破碎	8	V. 紫外吸收法	39
二、提取与纯化	10	VI. 二喹啉甲酸法(BCA 法)	42
第三章 实验误差控制	15	实验二 小麦钙调蛋白的分离、 纯化	44
第一节 实验误差	15	实验三 小麦钙调蛋白的抗体制备及 检测	46
一、实验误差	15	实验四 植物组织蛋白质二维电泳 分离分析	49
二、精密度和偏差	15	第五章 酶学研究技术与方法	59
三、实验误差的来源	16	第一节 酶活力测定及酶的纯度与回 收率	59
第二节 提高准确度的方法	17	一、酶活力测定	59
一、减少系统误差的方法	17	二、纯化方法与条件的比较标准	60
二、减少偶然误差的方法	18	三、纯度标准	60
三、正确取舍有效数字	18		
第四章 蛋白质研究技术与方法	20		
第一节 蛋白质分离纯化的一般 方法	20		
一、以蛋白质溶解度为基础的分 方法	20		
二、以蛋白质电荷性质为基础的分 方法	20		

第二节 酶活力测定的常用技术和方法..... 61	实验十二 一步法共提取昆虫中肠 DNA、RNA 及蛋白质 ..... 96
一、量气法 ..... 61	实验十三 小 RNA 的分离纯化 ..... 99
二、比色法与分光光度法 ..... 61	I. 小 RNA 分离、纯化及修饰 ..... 99
实验五 苯丙氨酸解氨酶的纯化及活性测定..... 62	II. 修饰后小 RNA 的克隆转化及测序 ..... 104
I. PAL 的提取及测定——离心和盐析的应用 ..... 63	III. 测序结果的生物信息学分析 ..... 106
II. PAL 的纯化——分子筛和离子交换层析的应用 ..... 65	实验十四 油菜 cDNA 文库的构建 ..... 107
实验六 Eadie - Hofstee 法测定辣根过氧化物酶的 $K_m$ 和 $v_{max}$ ..... 67	I. 植物组织总 RNA 的提取及电泳分析 ..... 107
实验七 酶偶联分析法测定植物己糖激酶的活力..... 70	II. cDNA 文库的构建 ..... 109
实验八 两相分配法制备大豆子叶质膜及其纯度鉴定..... 73	实验十五 Southern 印迹 ..... 112
实验九 金属螯合亲和层析分离纯化玉米 SOD ..... 79	<b>第七章 糖类研究技术和方法</b> ..... 118
实验十 大豆胰蛋白酶抑制剂的分离提取以及生物化学性质表征 ... 82	第一节 糖生物化学研究总论 ..... 118
<b>第六章 核酸研究技术和方法</b> ..... 90	第二节 糖的提取及纯化 ..... 119
第一节 核酸研究的基本要求..... 90	第三节 多糖的组成分析 ..... 119
一、材料与方法的选择 ..... 90	第四节 多糖的结构分析 ..... 121
二、选择的原则 ..... 90	实验十六 还原糖和总糖的测定 ..... 123
三、核酸完整性的保持 ..... 90	实验十七 非还原糖的高效液相色谱分析 ..... 125
第二节 技术路线的设计..... 91	实验十八 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析 ..... 128
一、核酸的释放 ..... 91	实验十九 黏多糖——肝素效价的测定 ..... 130
二、核酸的分离与纯化 ..... 91	实验二十 水溶性苦瓜多糖的制备及分离纯化 ..... 132
三、核酸质量与提取步骤的关系 ..... 91	实验二十一 醋酸纤维素薄膜电泳鉴定山楂多糖 ..... 135
四、核酸的浓缩、沉淀与洗涤 ..... 91	实验二十二 多糖结构分析 ..... 137
实验十一 植物基因组 DNA 的提取及含量、纯度检测 ..... 92	I. 糖含量测定 ..... 138
I. 植物基因组 DNA 的提取 (CTAB 法) ..... 92	II. 单糖组成分析 ..... 139
II. 植物 DNA 纯度的鉴定——紫外分光光度计法 ..... 94	III. 糖链的序列测定 ..... 140
III. 植物 DNA 相对分子质量的测定——琼脂糖凝胶电泳法 ..... 94	<b>第八章 植物次生代谢物概述</b> ..... 144
	第一节 次生代谢物的概念与特性 ... 144
	一、次生代谢物的概念 ..... 144
	二、次生代谢物的特性 ..... 144
	第二节 次生代谢物的研究方法 ..... 144

一、同位素示踪法 .....	145	实验二十七 植物材料中总黄酮	
二、细胞培养法 .....	145	分离提取及鉴定 .....	156
三、荧光标记法 .....	146	实验二十八 从茶叶中提取咖啡因 ...	157
四、单细胞凝胶电泳法 .....	146	<b>附录</b> .....	162
实验二十三 红豆杉紫杉醇生物碱的		附录一 离心技术 .....	162
分离与鉴定 .....	147	附录二 常用蛋白质 $M_r$ 标准参	
实验二十四 植物倍半萜的分离与		照物 .....	166
酸化度分析 .....	149	附录三 常用缓冲溶液的配制	
实验二十五 黄连中黄连素的提取		方法 .....	166
及其紫外光谱分析 .....	151	附录四 实验室中常用酸碱的相对	
I. 黄连中黄连素的提取 .....	151	密度和浓度 .....	172
II. 黄连素的紫外光谱分析 .....	152	附录五 硫酸铵饱和度的常用表 .....	173
实验二十六 虎杖蒽醌类成分的		附录六 常用相关网站 .....	174
提取分离及结构鉴定 ...	154	<b>主要参考文献</b> .....	176

# 第一章

## 缓冲溶液的作用原理及配制

### 第一节 缓冲溶液的作用原理

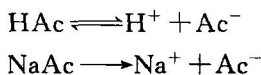
在生物化学实验中,常采用缓冲体系来精确模拟生物体内的自然环境,从而保证生物活性大分子的分离、纯化与制备工作的正常进行。因此合理地选择和配制缓冲溶液(或缓冲液)是实验中非常重要的环节之一。

#### 一、缓冲溶液的作用原理

丹麦化学家 Brönsted 和英国化学家 Lowry 于 1923 年同时提出的酸碱质子学说,被后人称为酸碱质子理论或 Brönsted - Lowry 酸碱理论。他们认为凡能释放质子的分子或离子(如  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HSO}_4^-$  等)称为酸,凡能接受质子的分子或离子(如  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Cl}^-$  等)称为碱。因此,一种酸释放质子后即成为碱,此种碱称为该酸的共轭碱;同理,一种碱与质子结合后,形成对应的酸,称为该碱的共轭酸。缓冲溶液之所以具有缓冲性,是因为这种溶液中既含有足够量的能够抵抗外加酸的成分,即抗酸成分,又含有足够量的抵抗外加碱的成分,即抗碱成分。通常把抗酸成分和抗碱成分称为缓冲对。根据缓冲组分的不同,缓冲溶液一般分为以下 3 种类型:

- (1) 弱酸及其共轭碱,如  $\text{HAc} - \text{NaAc}$  缓冲液、 $\text{H}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$  缓冲液。
- (2) 弱碱及其共轭酸,如  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{NH}_4\text{Cl}$  缓冲液。
- (3) 多元酸的两性物质组成的共轭酸碱对,如  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液。

现以一元弱酸  $\text{HAc}$  与其共轭碱  $\text{NaAc}$  组成的缓冲溶液为例来说明缓冲作用的原理。



$\text{NaAc}$  是强电解质,在溶液中完全解离,因此溶液中有大量的  $\text{Ac}^-$  存在。由于大量  $\text{Ac}^-$  的存在,解离平衡产生同离子效应,而  $\text{HAc}$  又属于弱电解质,因此在该缓冲体系中有大量的  $\text{HAc}$  和  $\text{Ac}^-$  存在,而  $[\text{H}^+]$  很低。

当在此溶液中加入少量强酸时,由于溶液中存在着大量的  $\text{Ac}^-$ ,可以与强酸解离出的  $\text{H}^+$  结合成解离度很小的  $\text{HAc}$ ,结果使溶液中的  $[\text{H}^+]$  几乎没有升高,所以溶液中的  $\text{pH}$  几乎没有降低。在这种情况下, $\text{Ac}^-$  成为缓冲溶液的抗酸成分。当在缓冲溶液中加入强碱时,此时溶液中的  $\text{H}^+$  立即与加入的  $\text{OH}^-$  结合成难解离的  $\text{H}_2\text{O}$ 。当溶液中的  $[\text{H}^+]$  稍有降低时,溶液中大量存在的  $\text{HAc}$  使得减少的  $\text{H}^+$  立刻得到补充,结果使得溶液中  $[\text{H}^+]$  几乎没有降低,即溶液中的  $\text{pH}$  变化甚微。此时, $\text{HAc}$  成为缓冲溶液的抗碱成分。当溶液稍加稀释时,溶液中的  $[\text{H}^+]$  虽然降低了,但与此同时  $[\text{Ac}^-]$  也降低了,由于同离子效应的减弱,促使  $\text{HAc}$  的解离度提高,所产生的



H<sup>+</sup>可以维持溶液的 pH 基本恒定。

## 二、缓冲容量与缓冲范围

缓冲溶液的缓冲能力是有限的,当加入过多酸或碱时,缓冲能力就会失去。缓冲溶液的缓冲能力可用缓冲容量( $\beta$ )来衡量:缓冲容量是指使 1 L 或 1 mL 缓冲溶液的 pH 改变一个单位所需加入一元强酸或一元强碱的物质的量(mol 或 mmol)。

$$\beta = \frac{\Delta n}{|\Delta \text{pH}|} \quad (1.1)$$

式中, $\Delta n$  为单位体积缓冲溶液的 pH 改变  $\Delta \text{pH}$  个单位时所加一元强酸或一元强碱的物质的量。缓冲容量均为正值。通常缓冲容量的单位为 mol/(L · pH)。

影响缓冲容量的主要因素:

### 1. 缓冲溶液总浓度

当缓冲比[共轭碱]/[共轭酸]一定时,缓冲溶液的总浓度愈大,缓冲能力就愈大。在一定范围内稀释时,缓冲容量也减小。所以过量稀释将导致缓冲溶液的缓冲能力显著降低。

### 2. 缓冲比

当缓冲溶液的总浓度一定时,若[共轭碱]/[共轭酸]=1,则缓冲容量最大。此时,溶液的  $\text{pH} = \text{p}K_a$ 。缓冲比离 1 愈远,pH 偏离  $\text{p}K_a$  愈远,缓冲容量愈小。

实验和计算表明,当缓冲比在 1/10 至 10/1 之间时,即溶液的 pH 在  $\text{p}K_a - 1$  至  $\text{p}K_a + 1$  之间时,溶液具有较大的缓冲能力。在化学上把具有缓冲作用的 pH 范围,即  $\text{pH} = \text{p}K_a \pm 1$  称为缓冲溶液的缓冲范围。

## 第二节 缓冲溶液的配制

### 一、影响缓冲溶液 pH 的因素及缓冲溶液的选择与配制

#### (一) 影响缓冲溶液 pH 的因素

##### 1. 离子强度的影响

在缓冲溶液 pH 计算公式中,严格地说,所表示的公式应是共轭酸碱对之间的活度( $a$ )关系,即

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg (a_{\text{A}^-} / a_{\text{HA}}) \quad (1.2)$$

若上式中以浓度代替活度进行计算,忽略了活度系数,则造成计算的 pH 与测得的 pH 不完全相同。由于活度系数随溶液的离子强度变化而变化,像惰性盐(如 KCl)的加入或缓冲溶液的体积变化都会引起 pH 的改变,特别是对带高价电荷的组分影响则更为明显。例如,如果将 pH 为 6.6 的 0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲液浓度稀释 10 倍,它的 pH 则会上升到 6.9。

##### 2. 温度的影响

缓冲溶液的  $\text{p}K_a$  受温度影响较大。例如,Tris 缓冲液对温度的依赖性表现相当明显。温度每升高 1℃,  $\text{p}K_a$  就下降约 0.031 个单位。在 25℃ 制备的 pH 为 8.08 的 Tris 缓冲液温度改变为 4℃ 和 37℃ 时, pH 会大致改变至 8.7 和 7.7。

## (二) 缓冲溶液的配制方法与选择原则

在掌握了缓冲溶液作用原理的基础上,须掌握缓冲溶液的配制方法。缓冲溶液的选择和配制可以按下列步骤进行:首先,选择合适的缓冲对。缓冲对的选择原则即所需配制缓冲溶液的 pH 要等于或接近所选缓冲对中弱酸的  $pK_a$ 。如配制 pH=5 的酸性缓冲溶液,可选 HAc-NaAc 缓冲对,因为  $pK(HAc)=4.75$ ,与要配制的缓冲溶液的 pH 接近。其次,是选择合适的浓度。为了使缓冲溶液具有足够抗酸、抗碱的成分,缓冲组分的浓度应当适当控制得大些,一般选择在 0.01~0.5 mol/L。缓冲溶液配制的方法比较多,这里介绍三种方法:

(1) 把两个缓冲组分都配成相同浓度的溶液,然后按照一定的体积比混合。

(2) 在一定量的弱酸(或弱碱)中加入一定量的强碱(或强酸),通过中和反应形成由其共轭碱(或共轭酸)和剩余的弱酸(或弱碱)组成的缓冲溶液。

(3) 在一定量的弱酸(或弱碱)溶液中加入对应的固体共轭碱(或共轭酸)。

第一节已提到,由一对共轭酸碱对组成的缓冲溶液,它们的缓冲范围都比较窄( $pH=pK_a \pm 1$ )。在实际应用过程中,为了使同一缓冲溶液能在较广泛的 pH 范围内起缓冲作用,可以采用多元弱酸和弱碱组成的缓冲体系。例如,将柠檬酸( $pK_{a1}=3.13, pK_{a2}=4.76, pK_{a3}=6.4$ )和磷酸氢二钠(磷酸的  $pK_{a1}=2.12, pK_{a2}=7.2, pK_{a3}=12.36$ )两种溶液按照不同的比例混合,便可得到 pH 为 2~8 的一系列缓冲溶液。其原因在于这种缓冲体系有多个  $pK_a$  不同的共轭酸碱对发挥作用。此外,还可以选用一定浓度的多种弱酸(或弱碱)组分,与一定浓度的 NaOH(或 HCl)溶液按照不同比例混合,配制成具有广泛 pH 范围的一系列缓冲溶液。这类缓冲溶液的配方可在相关手册中查得。

## 二、缓冲溶液的应用原则

在实际应用中,选用缓冲溶液时要考虑一些因素。

### 1. 缓冲溶液 pH 的确定

大部分生物化学反应发生在 pH 6.0~8.0 的范围,故理想的缓冲溶液中缓冲试剂的  $pK_a$  应尽可能在这个范围内,以保证最大的缓冲容量。

### 2. 缓冲溶液成分

理想状态下,缓冲溶液成分不能穿过细胞膜进入到细胞内部,否则将对细胞内部组分造成伤害,因此应该尽量选取对细胞膜有较低通透性的试剂来配置缓冲溶液。

### 3. 正常的阴、阳离子相互作用

缓冲溶液中的各种阴、阳离子会与细胞中的分子和离子相互作用而形成复杂的聚合物,因此在使用缓冲溶液时要避免不溶性复合体的形成。

### 4. 缓冲溶液的稳定性

缓冲溶液应该具有一定的化学稳定性,不被一些酶促或非酶促反应所破坏。

## 三、不同缓冲溶液的优缺点

### (一) 磷酸盐缓冲液

磷酸盐是生物化学研究中使用最广泛的一种缓冲剂。由于它们是二级解离,有两个  $pK_a$  值,故用它们所配制的缓冲液 pH 范围最宽:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :  $\text{p}K_{a1}=2.12$ ,  $\text{p}K_{a2}=7.21$ ;  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ :  $\text{p}K_{a1}=7.21$ ,  $\text{p}K_{a2}=12.32$ 。

配酸性缓冲液: 用  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=1\sim 4$ ;

配中性缓冲液: 用混合的两种磷酸盐,  $\text{pH}=6\sim 8$ ;

配碱性缓冲液: 用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{pH}=10\sim 12$ 。

用钾盐比钠盐好, 因为低温时钠盐难溶, 钾盐易溶, 但若配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳缓冲液时, 只能用磷酸钠而不能用磷酸钾, 因为 SDS(十二烷基硫酸钠)会与钾盐生成难溶的十二烷基硫酸钾。

磷酸盐缓冲液的优点为: ① 容易配制成各种浓度的缓冲溶液; ② 适用的 pH 范围宽; ③ pH 受温度的影响小; ④ 缓冲溶液稀释后 pH 变化小, 如稀释 10 倍后 pH 的变化小于 0.1。

其缺点为: ① 易与常见的钙离子、镁离子以及重金属离子缔合生成沉淀; ② 会抑制某些生物化学过程, 如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。

#### (二) Tris(三(羟甲基)氨基甲烷, Tris(hydroxymethyl) aminomethane)缓冲液

Tris 缓冲液在生物化学研究中使用较多。Tris 缓冲液常用有效 pH 范围是在“中性”范围。例如:

Tris-HCl 缓冲液:  $\text{pH}=7.5\sim 8.5$ ;

Tris-磷酸盐缓冲液:  $\text{pH}=5.0\sim 9.0$ 。

Tris-HCl 缓冲液的优点在于: ① Tris 为有机缓冲液, 比较温和, 适应范围很广; ② 对生物化学过程干扰很小, 不与钙、镁离子及重金属离子发生沉淀。

其缺点是: ① 缓冲溶液的 pH 受溶液浓度影响较大, 缓冲溶液稀释 10 倍, pH 的变化大于 0.1; ② 温度效应大, 温度变化对缓冲溶液 pH 的影响很大, 即  $\Delta\text{p}K_a/^\circ\text{C}=-0.031$ , 例如,  $4^\circ\text{C}$  时缓冲溶液的  $\text{pH}=8.4$ , 而  $37^\circ\text{C}$  时的  $\text{pH}=7.4$ , 所以一定要在使用温度下进行配制; ③ 易吸收空气中的  $\text{CO}_2$ , 所以配好的缓冲溶液要密封。

#### (三) 有机酸缓冲液

这一类缓冲溶液多数是用羧酸与它们的盐配制而成, pH 范围为酸性, 即 pH 为 3.0~6.0, 最常用的是甲酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸等。甲酸-甲酸盐缓冲液很有用, 因其挥发性强, 使用后可以用减压法贮存。乙酸-乙酸钠和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系使用也较多, 柠檬酸有三个  $\text{p}K_a$  值:  $\text{p}K_{a1}=3.10$ ,  $\text{p}K_{a2}=4.75$ ,  $\text{p}K_{a3}=6.40$ ; 琥珀酸有两个  $\text{p}K_a$  值:  $\text{p}K_{a1}=4.18$ ,  $\text{p}K_{a2}=5.60$ 。

有机酸缓冲液的缺点是: ① 所有这些羧酸都是天然的代谢物, 因而对生物化学反应过程可能发生干扰作用; ② 柠檬酸盐和琥珀酸盐可以和过渡金属离子 ( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ) 及  $\text{Mg}^{2+}$  等结合而使缓冲溶液受到干扰; ③ 这类缓冲溶液易与  $\text{Ca}^{2+}$  结合, 所以样品中有  $\text{Ca}^{2+}$  时, 不能用这类缓冲溶液。

#### (四) 硼酸盐缓冲液

常用的有效 pH 范围是: 8.5~10.0, 因而它是碱性范围内最常用的缓冲溶液, 其优点是配制方便, 只使用一种试剂, 缺点是能与很多代谢物形成络合物, 尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲溶液受到干扰。

### (五) 氨基酸缓冲液

此类缓冲溶液使用的范围宽,可用于 pH 为 2.0~11.0,例如最常用的有:

甘氨酸-HCl 缓冲液:pH 为 2.0~5.0;

甘氨酸-NaOH 缓冲液:pH 为 8.0~11.0;

甘氨酸-Tris 缓冲液:pH 为 8.0~11.0(此缓冲液广泛用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极缓冲液);

组氨酸缓冲液:pH 为 5.5~6.5;

甘氨酸酰胺(glycinamide)缓冲液:pH 为 7.8~8.8;

甘氨酸甘氨酸(glycylglycine)缓冲液:pH 为 8.0~9.0。

此类缓冲液的优点是:为细胞组分提供更接近的天然环境。其缺点是:① 与羧酸盐和磷酸盐缓冲液相似,也会干扰某些生物化学反应过程,如代谢过程等;② 试剂的价格较高。

常用缓冲试剂的  $pK_a$  及其所配制缓冲溶液的缓冲范围列于表 1-1 和表 1-2,供实验时参考。

表 1-1 常用缓冲试剂的  $pK_a$  及其所配制缓冲溶液的缓冲范围

缓冲溶液	$pK_a$	有效 pH 范围
盐酸-甘氨酸	2.4	1.4~3.4
盐酸-邻苯二甲酸氢钾	3.1	2.2~4.0
柠檬酸-氢氧化钠	2.9,4.1,5.8	2.2~6.5
甲酸-氢氧化钠	3.8	2.8~4.6
醋酸-氢氧化钠	4.74	3.6~5.6
邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钾	5.4	4.0~6.2
琥珀酸氢钠-琥珀酸钠	5.5	4.8~5.3
柠檬酸二钠-氢氧化钠	5.8	5.0~6.3
磷酸二氢钾-氢氧化钠	7.2	5.8~8.0
磷酸二氢钾-硼砂	7.2	5.8~9.2
磷酸二氢钾-磷酸氢二钾	7.2	5.9~8.0
硼酸-硼砂	9.2	7.2~9.2
硼酸-氢氧化钠	9.2	8.0~10.0
甘氨酸-氢氧化钠	9.7	8.2~10.1
氯化铵-氨水	9.3	8.3~10.3
氢氧化钠-碳酸钠	10.3	9.2~11.0
磷酸氢二钠-氢氧化钠	12.4	11.0~12.0

表 1-2 常用两性离子缓冲试剂的  $pK_a$  及其所配制缓冲溶液的缓冲范围(20℃)

pH	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	$pK_a$	
														MES	6.1
														ADA	6.6
														ACES	6.8
														PIPES	6.8
														MOPSO	6.9
														BES	7.1
														MOPS	7.2
														TES	7.4
														HEPES	7.5
														TRIS	8.1
														EPPS	8.0
														TRICINE	8.1
														BICINE	8.3
														TAPS	8.4
														GLYGLY	8.4
														CHES	9.3
														CAPS	10.4
															$pK_a$

MES; 2-(*N*-吗啉代)乙磺酸; ADA; *N*-(2-氨基-2-氧代乙基)-*N*-(羧甲基)甘氨酸; ACES; *N*-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸; PIPES; 哌嗪-*N,N'*-双(2-乙磺酸); MOPSO; 3-吗啉-2-羟基丙磺酸; BES; *N,N*-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸; MOPS; 3-(*N*-吗啉代)丙磺酸; TES; *N*-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸; HEPES; *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸; TRIS; 三(羟甲基)氨基甲烷; EPPS; *N*-(羟乙基)哌嗪-*N'*-丙磺酸; TRICINE; 三(羟甲基)甲基甘氨酸; BICINE; *N,N*-双(2-羟乙基)-甘氨酸; TAPS; 3-[三(羟甲基)甲基]氨基-1-丙磺酸; GLYGLY; 甘氨酸甘氨酸; CHES; 2-(环己胺)-1-乙磺酸; CAPS; 3-(环己胺)-1-丙磺酸

## 第二章

# 生物材料的预处理

实验结果分析的准确性,除与分析方法是否适宜、操作是否严格有关外,还与样品的采集、保存和预处理方法是否科学合理密切相关。根据生物样品中所检测目标物的特性,样品需采用不同保存和预处理方法,才能保证实验结果准确无误。

## 第一节 生物样品的保存

### 一、新鲜固态样品的保存

新鲜样品采集后,应尽快根据用途和分析检测目标化合物的不同,采用超低温速冻、杀青烘干或速冻干燥等方法进行保存。

#### (一) 超低温速冻

新鲜样品从种植地取回时,常沾有泥土或其他杂质,对于根系上的泥沙可用水轻轻清洗,枝叶等实验样品用柔软湿布擦净,不要用水冲洗,以免破坏植物材料的表皮和表面分泌物。然后,用可冷冻的塑料瓶、保鲜袋或牛皮纸袋分装,做好样品标签,放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中贮存。对于一些需要检测活性的酶、维生素以及挥发性成分的新鲜样品也可采用液氮速冻后,再放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中贮存,但超低温贮存时间最好不要超过半年。

#### (二) 杀青烘干

当实验分析的目标化合物是一些在高温下不挥发、不变性、理化性质稳定的物质时,为了保持样品中的化学成分不发生变化和损耗,必须及时终止样品中的酶活性和微生物的活动。这就需要将样品置于 $105\sim 110^{\circ}\text{C}$ 烘箱中杀青 $15\sim 20\text{ min}$ ,以达到迅速终止样品中酶促反应和灭活微生物的目的。然后将烘箱温度降至 $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ ,并打开鼓风机,恒温鼓风干燥至样品达恒重。杀青烘干的具体时间应根据样品种类、含水量、烘箱容积和通风性能等因素来确定。烘干时应注意温度不可过高,否则会将样品烤焦,特别是含糖量高的生物样品,高温下更易焦化。烘干后的样品需要进一步粉碎,然后放入具塞广口瓶或塑料袋中密封,置于干燥器中保存。

#### (三) 冷冻真空干燥

为了避免蛋白质、酶、维生素以及 $50^{\circ}\text{C}$ 以下挥发性成分变性、结构破坏和挥发损失,对于一些以这些物质为研究对象的新鲜生物材料,最好先在液氮中速冻,采用冷冻干燥机进行冷冻真空干燥。但需注意在冷冻干燥前,应将样品体积尽可能减小,以加快干燥速度,缩短干燥时间。冷冻干燥后的样品应放入具塞广口瓶或塑料袋中密封,置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

### 二、液态样品的保存

对于一些以液态收集的样品或已进行了匀浆,但未完成提取、纯化的新鲜样品,可加入甲苯、



苯甲酸等防腐剂和蛋白酶抑制剂,以终止样品中的酶活性和微生物的活动。然后置于 0~4℃ 冰箱中保存,但保存时间不宜超过两周。某些微生物、胞外酶及其代谢物可采用加入丙酮液脱水,然后冷冻真空干燥制成冻干粉,置于 0~4℃ 冰箱中,冷冻,可保存数月。

## 第二节 生物材料预处理技术

对于上述干燥、冷冻或新鲜样品需根据样品的种类、形态和待测组分的结构、性质不同,采用不同的方法在适当的溶剂(提取液)中进行组织细胞破碎。

### 一、细胞的破碎

除了体液和某些微生物分泌到胞外的蛋白质和多肽以外,大多数生物大分子都存在于细胞内。为了分离和提取细胞内的生物大分子,需将细胞或组织破碎。由于不同生物体或生物体不同组织和细胞的结构不同,细胞破碎的条件和方法也有所不同。必须根据具体情况进行选择,以便达到预期的效果。一般动物脏器的细胞膜较脆弱,容易破碎,而植物和微生物的细胞壁较牢固,需用专门破碎细胞的器械和采用不同的方法进行细胞破碎。目前,常用的细胞破碎方法主要有机械方法、物理方法、化学方法及酶学方法等。

#### (一) 机械破碎方法

通过机械运动所产生的剪切力的作用,使细胞破碎的方法称为机械破碎法。常用的机械有下列几种:

##### 1. 高速组织捣碎机

它是一种利用高速旋转刀片所产生的剪切力将组织细胞破碎的机械。刀片的转速可高达 10 000 r/min,适用于较脆嫩组织细胞的破碎。操作时,首先将欲捣碎的组织悬浮于水或其他液状介质中,配成稀糊状液体,然后放置于捣碎机玻璃杯或不锈钢杯内,容量不宜超过杯体积的一半,以免捣碎时溅出杯外。固定好杯盖后,将调速器调节在最低速位置,开动电动机,加速至 8 000~10 000 r/min,处理 30~40 s 后停机,间歇 30 s 再重复开机操作,直至组织细胞完全破碎。这种间歇式捣碎可以避免刀片高速旋转产生的热量导致温度升高使某些生物大分子变性。此外,为减少发热,操作时,可使用双层捣碎杯,在外层与内层杯之间放入一些冰块,使样品杯置于冰浴中操作。对于难于破碎的酵母菌或植物组织可在杯内加入一定量的石英砂进行捣碎。

##### 2. 匀浆器

匀浆器是常用来破碎那些比较柔软、易于分散的组织细胞的器具,一般由玻璃制成。匀浆器由一根内壁经磨砂的管和一根表面经磨砂的研杵组成。管和研杵必须配套使用,研杵与管内壁之间仅有几百微米的间隙。

匀浆器的细胞破碎程度比组织捣碎机高,而且其机械剪切力对生物大分子的破坏较少。操作时,先将欲破碎的组织细胞配成糊状置于管内,再套入研杵用手工来回研磨,或把研杵连接在电动搅拌器上,用手握住管,上下移动,即可将组织细胞破碎。

##### 3. 研磨器

通常由陶瓷或玻璃制的研钵和研杵组成,常用于微生物与植物细胞的破碎。操作时,

将欲破碎的材料置于研钵中,用手持研杵反复研磨,即可将组织细胞研碎。为了提高研磨效果可加入少量的精制石英砂,但加石英砂时要注意其对需检测成分是否有吸附作用。还可将研钵置于冰浴中进行研磨或加入液氮研磨,以防止蛋白质、酶、核酸等生物大分子变性失活和被水解酶降解。

## (二) 物理破碎方法

通过各种物理因素的作用,使组织细胞破碎的方法,统称为物理破碎方法。常用的物理因素有温度、压力、超声波等。物理破碎方法多用于微生物细胞的破碎。

### 1. 冻融法

它是一种通过温度的反复变化,使样品细胞破碎的方法。操作时,可将样品投入沸水中,在90℃左右的温度下维持数秒钟,然后立即置于冰浴中迅速冷却。也可将样品冷冻至-18℃左右,使其冻结,然后迅速升温,均可将细胞破碎。上述操作可反复进行,使细胞破碎更完全。

### 2. 压榨法

它是一种通过施加压力使细胞破碎的方法。如将细胞悬浮于蒸馏水中,利用细胞内外渗透压的不同使细胞破碎。也可用30 MPa左右的水压或气压将细胞压碎或挤破。此法温和,但需要相应的压榨设备。

### 3. 超声波法

超声波是指频率超过人耳可听范围(16~20 kHz)的波,即频率为20 kHz以上的波称为超声波。通过超声波的作用,可使细胞结构解体,从而使细胞破碎。超声波细胞破碎器一般由超声波发振器、振动子和喷嘴三部分组成。一般在超声波发振器上有时间控制和功率控制两个指示器,可根据需要进行调整和控制。喷嘴有不同的规格,可根据样品的量进行选择。

超声波破碎的效果与样品浓度、超声波频率、输出功率和破碎时间有密切关系。对于大肠杆菌细胞,细胞质量浓度常选用在50~100 mg 菌体/mL,频率一般选择在20 kHz,输出功率一般选用在100~200 W范围,可根据喷嘴的规格和样品的量而改变。破碎时间一般为3~15 min。为减少发热,操作时,可在冷库中进行,或将样品置于冰浴中,并采用间歇操作。例如,破碎30 s至1 min,间歇1 min,如此反复进行。超声波破碎多用于微生物和单细胞生物的破碎,然而不同的生物细胞所要求的破碎条件是不同的。此外,要注意避免样品中气泡的存在。一些对超声波敏感的生物大分子,在处理时要仔细选择条件,以免生物大分子变性失活。

## (三) 化学破碎方法

通过化学试剂的作用,使细胞膜的结构改变或破坏,导致细胞膜的透性改变,而使细胞破碎的方法称为化学破碎方法。常用的化学试剂可分为有机溶剂和表面活性剂两大类。常用的有机溶剂主要有丙酮、甲苯、丁醇、氯仿等。常用的表面活性剂有SDS、氯化十二烷基吡啶、吐温(Tween)、Triton和胆酸盐等。在实际操作时,应根据不同的细胞和待分离的生物大分子不同,选用不同的化学试剂和不同的处理条件。

## (四) 酶学破碎方法

通过外加或细胞本身存在的酶的作用,使细胞破碎的方法称为酶学破碎方法。

### 1. 外加酶制剂

溶菌酶有降解细菌细胞壁的功能。对于酵母,则采用 $\beta$ -葡聚糖酶,而霉菌则用几丁质酶等,在一定的温度和pH条件下,保温一段时间,细胞壁即被破坏。对于植物材料,一般

采用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶等,破坏植物细胞间的联系和细胞壁,而达到破碎细胞的目的。

## 2. 自溶和溶胀

将欲破碎的细胞在一定的 pH 条件和适宜的温度下保温一定的时间,通过细胞自身存在的酶系作用,将细胞破坏,使细胞内物质释出的方法称为自溶法。动物细胞的自溶温度一般选在 0~4℃,而微生物细胞的自溶多在室温条件下进行。自溶时,为了防止外来微生物的污染,可加少量甲苯、氯仿、叠氮钠等防腐剂。

动物细胞置于低渗溶液中时,由于细胞内外存在渗透压差,溶剂分子将大量进入细胞,最终将细胞膜胀破的现象称为溶胀。此法常用于从动物红血球中提取血红素的实验。

## 二、提取与纯化

提取是在一定条件下用一定的溶剂处理样品,使被分离的物质充分释放到溶剂中的过程,又称为抽提或萃取。影响提取的主要因素是待提取的物质在所使用的溶剂中的溶解度大小,以及该物质向溶剂相扩散的难易。一种物质在某一溶剂中的溶解度大小与该物质的分子结构及所使用的溶剂的理化性质有密切关系。一般来说,极性物质易溶于极性溶剂中,非极性物质易溶于非极性的有机溶剂中,酸性电解质易溶于碱性溶剂中,碱性物质易溶于酸性溶剂中;温度升高,溶解度一般增大;两性电解质在等电点时,溶解度最小。

从细胞或细胞碎片中提取生物大分子还受到扩散作用的影响。固体溶解于液体的扩散速率与温度、溶液黏度、扩散面积、扩散距离以及两相界面之浓度差有密切关系。一般说来,增加温度,降低溶液黏度,增加扩散面积,减少扩散距离,保持两相界面的最大浓度差,延长扩散时间等方法都有利于提高扩散速率,从而使提取效果增加。

### (一) 蛋白质和酶的提取

蛋白质和酶的种类繁多,在提取时,应根据其存在部位、分子结构及溶解性质的不同,选择不同的提取方法。首先要根据蛋白质和酶在生物体中的存在部位,决定是否进行细胞破碎。存在于体液或胞外的蛋白质和酶不需经细胞破碎,而存在于细胞内的蛋白质和酶一般要使细胞破碎,然后,再根据欲提取蛋白质和酶的结构及溶解性质的不同选择适当的溶剂进行提取。溶于水的可用水溶液提取,不溶于水的则用相应有机溶剂提取。

大多数蛋白质和酶均能溶于水或稀盐、稀酸、稀碱溶液中。因此,蛋白质和酶的提取一般采用水溶液提取。其中稀盐溶液和缓冲溶液对蛋白质的溶解度大,稳定性好,在蛋白质和酶的提取过程中经常采用。提取时,要注意控制好盐浓度、温度、pH 等条件。

#### 1. 盐浓度的选择

盐浓度的高低直接影响蛋白质和酶的溶解度。一般选用等渗盐溶液进行提取,例如,0.15 mol/L 氯化钠溶液(生理盐水)、0.02~0.5 mol/L 磷酸缓冲液或碳酸缓冲液、0.1 mol/L 氯化镁溶液等。有些蛋白质在低盐溶液中溶解度低,需要采用较高浓度的盐溶液提取。例如,脱氧核糖核蛋白需要用 1 mol/L 氯化钠溶液提取;而某些蛋白质,如某些霉菌中的脂肪酶,则用纯水提取的效果较好。

#### 2. pH 的选择

溶液的 pH 与蛋白质和酶的溶解度及稳定性有密切关系。为了增大蛋白质的溶解度,提取